

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimen.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### 1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Katolik Widya Mandira Kupang & Laboratorium Farmasi Bahan Alam Prodi Farmasi Poltekkes Kemenkes Kupang.

##### 2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan April sampai Mei 2025

#### **C. Populasi Dan Sampel**

Populasi : Daun gamal (*Gliricidia Sepium*) yang diambil dari Liliba, Kecamatan Oebobo, Nusa Tenggara Timur

Sampel : Ekstrak daun gamal dengan konsentrasi larutan uji 25, 50, 75 dan 100%.

#### **D. Variabel Penelitian**

##### 1. Variabel bebas

Konsentrasi ekstrak etanol daun gamal dengan konsentrasi larutan uji 25, 50, 75 dan 100% b/v .

##### 2. Variabel terikat

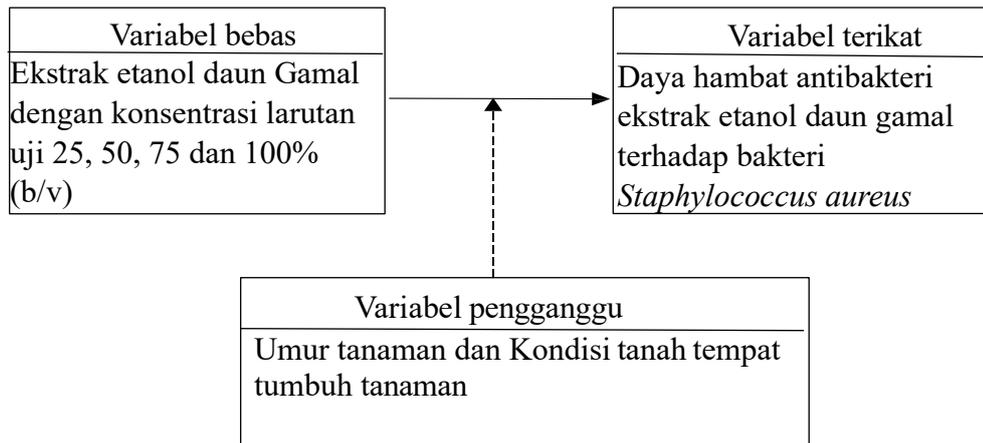
Aktivitas antibakteri ekstrak etanol 95% daun gamal terhadap bakteri

*Staphylococcus aureus*.

### 3. Variabel pengganggu

Umur tanaman dan kondisi tanah tempat tumbuhnya daun gamal.

### E. Kerangka konsep



Keterangan :

—————> : Yang diteliti

-----> : Yang tidak diteliti

## F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Skala
1.	Aktivitas Antibakteri	Kemampuan ekstrak daun gamal dalam menghambat bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	Jangka sorong	Ordinal
2	Ekstrak daun gamal	Ekstrak kental yang diperoleh dari evaporasi filtrat maserasi serbuk simplisia daun gamal.	-	Nominal
3	Metode Uji	Cara menguji aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran	-	Nominal
4	Bakteri Uji	Kultur murni <i>Staphylococcus aureus</i> yang diambil dari Unika kupang dengan ATCC 6538.	-	Nominal
5	Zona hambat	Daerah bening yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri disekitar lubang sumuran	Jangka sorong	Ratio

## G. Alat dan bahan

### a. Alat

Beaker gelas, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, kaca arloji, pipet volume, mikropipet, Pipet tetes, batang pengaduk, cawan petri, timbangan elektrik, hot plate, bejana maserasi, inkubator, autoklaf,

*Laminar Air Flow* (LAF), jarum ose, sendok tanduk, jangka sorong, *cork borrer* 5 mm, rak tabung reaksi, blender, bunsen, kasa, tissue, kertas saring, aluminium foil, kertas label.

**b. Bahan**

Ekstrak daun gamal, isolate *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Nutrient agar*, *Nutrient broth*, NaCl 0.9 %, aquades steril, alkohol 95%, alkohol 70%, Larutan MC Farland, spritus, asam sulfat, asam asetat dan Co-amoksisilav.

**H. Prosedur Penelitian**

**a. Tahap persiapan**

Sebelum melakukan penelitian dan pengumpulan data terlebih dahulu dipersiapkan beberapa kelengkapan penelitian yaitu persiapan alat dan bahan yang digunakan dan sterilisasi alat dan bahan.

**b. Pembuatan simplisia daun gamal (*Gliricidia Sepium*)**

Pembuatan simplisia diawali dengan mengumpulkan daun gamal, sortasi basah kemudian dicuci kemudian keringkan menggunakan sinar matahari (sampel ditutup kain hitam) hingga benar-benar kering. Selanjutnya dilakukan sortasi kering untuk memisahkan bagian yang rusak atau tidak dipakai. Setelah itu, simplisia dihaluskan dengan cara di blender dan kemudian diayak serbuk simplisia menggunakan ayakan dengan nomor mesh 60 (Depkes, 2008).

### c. Ekstraksi daun gamal

Sebanyak 350 g serbuk daun gamal direndam dalam 3 L etanol 95% (75 bagian pelarut). Perendaman ini dilakukan selama 3 hari. Setelah proses maserasi selesai, campuran disaring dan filtratnya dipisahkan dari residu. Residu diremaserasi dengan menambahkan 1 L etanol 95% (25 bagian pelarut). Proses remaserasi berlangsung selama 2x24 jam, dimana campuran diaduk setiap harinya. Setelah proses remaserasi selesai, filtrat dipisahkan lagi dengan cara menyaring campuran hasil remaserasi. Filtrat hasil maserasi digabungkan dengan filtrat hasil remaserasi dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga menghasilkan filtrat yang sedikit kental. Penguapan dilanjutkan dengan bantuan *waterbath* untuk memperoleh ekstrak kental dan rendemennya ditentukan menurut persamaan berikut ini.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak (gram)}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

### d. Uji bebas etanol

Untuk memastikan bahwa ekstrak daun gamal telah bebas dari pelarut penyari, keberadaan etanol dikonfirmasi melalui reaksi esterifikasi. Ekstrak etanol daun gamal ditambahkan asam sulfat pekat dan asam asetat, kemudian campuran tersebut dipanaskan. Adanya sisa etanol dalam sampel akan bereaksi dengan asam sulfat dan menghasilkan senyawa ester yang dikarakterisasi oleh aroma khas buah-buahan atau permen karet. Jika bau tersebut tidak terdeteksi, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak telah bebas dari etanol.

**e. Pembuatan media**

Timbang 3,6 gram *Nutrient Agar* dan campurkan dengan 180 mL aquadest untuk membuat lapisan dasar. Kemudian, timbang 0,4 gram *Nutrient Broth* dan tambahkan 20 mL aquadest untuk membuat lapisan biji. Kemudian, masukkan keduanya ke dalam erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya, gunakan hotplate untuk memanaskan media *Nutrient Agar* dan *Nutrient Broth* hingga larut dan mendidih. Selanjutnya, proses sterilisasi media menggunakan autoklaf dengan temperatur 121°C selama 15 menit. Selanjutnya media base layer yang telah steril dituangkan kedalam cawan petri steril sebanyak 20 mL dan dilaksanakan di dalam LAF.

**f. Inokulasi Bakteri pada Media Agar Miring**

Media *Nutrient Agar* steril yang telah dipanaskan dan dibiarkan beberapa menit. Selanjutnya, *nutrient agar* yang telah dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dimiringkan dan dibiarkan mengeras. Bakteri uji dari kultur persediaan bakteri diremajakan dengan cara memindahkan satu atau dua ose bakteri uji menggunakan jarum ose kemudian digoreskan pada media didalam tabung reaksi yang berbeda. Lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri uji disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu 4°C sebagai stok bakteri.

**g. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji**

Bakteri uji yang telah diinokulasi dengan jarum ose diambil kemudian disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 mL larutan NaCl 0,9%

hingga diperoleh tingkat kekeruhan yang sama dibandingkan dengan standar larutan Mc. Farland 0.5.

**h. Pembuatan media pengujian**

Masing-masing 20 mL *Nutrient Agar* (NA) dituangkan ke dalam 9 cawan petri sebagai media dasar, kemudian dibiarkan hingga mengeras. Setelah media mengeras, suspensi bakteri digabungkan dengan media pembenihan *Nutrient Broth* (NB). Selanjutnya, 2 mL campuran suspensi dan media pembenihan dituangkan ke setiap cawan petri sebagai lapisan dasar (*seed layer*) dan diratakan menggunakan alat spider. Media tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi, cawan petri dilubangi secara aseptik menggunakan *cork borer* berdiameter 5 mm sehingga terbentuk sumur-sumur untuk uji antibakteri.

**i. Pembuatan konsentrasi Larutan Uji**

Larutan uji dengan konsentrasi 100% dibuat dengan cara menimbang 5 gram ekstrak daun gamal, lalu ekstrak tersebut dilarutkan ke dalam 5 mL aquades steril. Untuk larutan uji dengan konsentrasi 75%, sebanyak 3,75 gram ekstrak daun gamal ditimbang dan dilarutkan dalam 5 mL aquades steril. Sedangkan larutan dengan konsentrasi 50% dipersiapkan dengan menimbang 2,5 gram ekstrak dan dilarutkan ke dalam 5 mL aquades steril, kemudian larutan tersebut dihomogenkan agar tercampur sempurna. Selanjutnya, larutan uji dengan konsentrasi 25% disiapkan dengan menimbang 1,25 gram ekstrak daun gamal yang kemudian dilarutkan dalam 5 mL air aquades steril. (Allow *et al*, 2022).

**j. Pembuatan larutan kontrol**

Kontrol positif dibuat dari sediaan obat Co-amoxiclav dengan sebanyak 30 mg Co-amoxiclav ditimbang dan dilarutkan ke dalam 100 mL aquadest untuk memperoleh larutan stok Co-amoxiclav 300  $\mu\text{g}$

**k. Pengujian efektivitas ekstrak daun gamal**

Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  ekstrak etanol daun gamal yang telah dibuat menjadi beberapa seri konsentrasi (25, 50, 75, dan 100%) diambil dan ditempatkan pada lubang sumuran di cawan petri. Selanjutnya, cawan yang telah berisi ekstrak ini diinkubasi selama 24 jam pada inkubator. Setelah proses inkubasi telah selesai, pengamatan diameter zona hambar dilakukan menggunakan jangka sorong. Perlakuan yang sama juga diterapkan untuk amoxiclav dan akuadest yang berperan sebagai kontrol positif dan negatif. Pengamatan zona hambat dilakukan dari satu tepi (breakpoint) ke tepi yang berlawanan, melalui titik pusat lubang sumuran. Jika tidak terdapat zona hambat di sekitar lubang sumuran, maka diameter zona hambat tersebut dianggap 0 mm. Selanjutnya, diameter zona hambat tersebut dikategorikan berdasarkan tingkat kekuatan daya antibakterinya sesuai dengan penggolongan yang telah ditetapkan.

**l. Analisis Data**

Data yang diperoleh berupa data ukuran zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* yang diinterpretasikan kedalam beberapa kategori aktivitas, zona hambat dengan jarak  $< 5$  mm kategorikan

lemah, 5-10 mm dikategorikan sedang, 10-20 mm dikategorikan kuat dan >20 dikategorikan sangat kuat (Davis & Stout 1979).